



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0061611
(43) 공개일자 2016년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) *A23C 9/123* (2006.01)
A23K 20/195 (2016.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01) *A61P 31/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0164110

(22) 출원일자 2014년11월24일

심사청구일자 2015년10월19일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

임영희

서울특별시 서대문구 통일로25길 30 108동 208호(홍제동, 한양아파트)

심인숙

경기도 안산시 상록구 본오로 145, 105동 603호(본오동, 우성아파트)

박근태

경기도 안양시 동안구 관평로138번길 63, 703동 311호 (평촌동)

(74) 대리인

특허법인충현

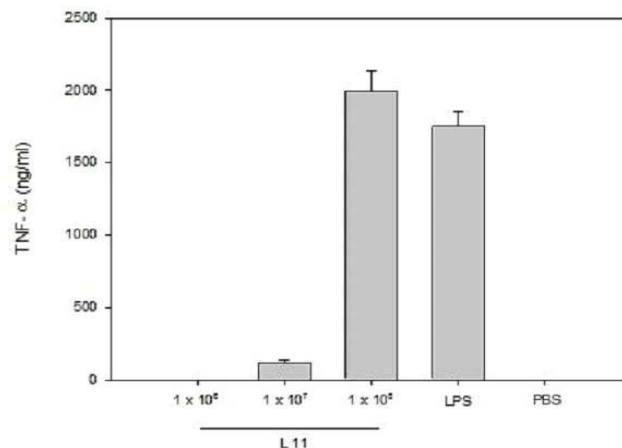
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 신규한 엔테로코커스 페시움 L11 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물

(57) 요약

본 발명은 신규한 엔테로코커스 페시움 L11(*Enterococcus faecium* L11) 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 엔테로코커스 페시움 L11 균주 또는 이의 배양물은 여러 병원성 미생물에 대한 항균 효과를 가지며, 내산성, 인공위액 내성, 내담즙성 및 면역증강 효과가 우수하므로 생균제, 의약품, 건강식품, 유산균제제, 사료첨가제 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KFCC11572P의 엔테로코커스 페시움 L11 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 닭으로부터 분리된 것임을 특징으로 하는 엔테로코커스 페시움 L11 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 사이토카인 IL-6 및 TNF- α 의 생성을 유도하는 것을 특징으로 하는 엔테로코커스 페시움 L11 균주.

청구항 4

제1항의 엔테로코커스 페시움 L11 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물.

청구항 5

제1항의 엔테로코커스 페시움 L11 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 병원성 미생물에 의해 발생되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 병원성 미생물에 의해 발생되는 질환은 급성 설사, 장염, 위장관염, 변비, 복통, 복부팽만, 콜레라 및 식중독으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 병원성 미생물에 의해 발생되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항의 엔테로코커스 페시움 L11 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 병원성 미생물에 의해 발생되는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제1항의 엔테로코커스 페시움 L11 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 유산균 제제.

청구항 9

제1항의 엔테로코커스 페시움 L11 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 발효유.

청구항 10

제1항의 엔테로코커스 페시움 L11 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 신규한 엔테로코커스 페시움 L11(*Enterococcus faecium* L11) 균주 및 이를 유효성분으로 포함하는 생

[0001]

균제 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 유산균(Lactic acid bacteria)은 각종 발효식품, 사람과 동물의 장관, 토양 등 자연계에 널리 분포하고 우리의 삶과 밀접한 관련이 있다. 유산균은 장내 미생물의 균형을 유지하고 항균물질(bacteriocin)과 다량의 젖산(lactic acid), 초산(acetic acid)을 생성하여 식품 부패균의 성장을 억제하고, 식품의 보존성 향상에 기여하는 등 유익한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Ahn SB et al., J. Biomed. Res. 13(4): 353-356, 2012).
- [0003] 따라서, 최근에는 다양한 유산균을 생균제로 사용하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 생균제는 장내미생물 균형에 도움을 주고 항균활성과 효소활성을 가지면서 숙주에 유용한 각종 대사산물을 생산함으로써 숙주의 건강 증진과 사료효율을 증대시키는 효과를 보이는 미생물을 총괄하며(fuller, R. J appl bacteriol. 66(5):365-378, 1989), 인체 의약품인 정장제나 유산균 제제, 사료첨가제 및 건강식품 등의 다양한 분야에 사용되고 있다. 일반적으로 생균제로 사용되기 위해서는 경구로 섭취하여 대장과 직장에 도달하고, 숙주의 장내를 서식지로 하며, 비병원성 및 무독성이 요구된다. 따라서 생균제제는 기본적으로 장내환경(산, 효소, 담즙)에 대한 내성과 우수한 기능성(항미생물제 생성능, 면역 촉진능, 병원성 세균의 억제능, 정착성)을 지녀야 하는데, 이러한 조건을 모두 갖춘 유산균은 드문 실정이다.
- [0004] 한편, 엔테로코커스 속 미생물은 생균제 제조의 원료 미생물로 연구되고 있으며, 선행기술로는 한국등록특허 제 10-0468522호, 한국등록특허 제 10-0523255호 등이 있다.
- [0005] 이에, 본 발명의 발명자들은 엔테로코커스 속의 균주가 생균제로서 사용될 수 있다는 사실에 착안하여 연구한 결과, 신규한 엔테로코커스 폐시움 균주를 동정하였고, 상기 균주 및 이의 배양물이 내산성, 내담즙산성 및 위 해미생물에 대한 항균 활성 및 면역증강 효과가 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 신규한 균주인 기탁번호 KFCC11572P의 엔테로코커스 폐시움 L11 균주를 제공하고 또한, 이의 용도로서 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물, 병원성 미생물에 의해 발생 되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 병원성 미생물에 의해 발생 되는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 유산균 제제, 발효유 및 사료 첨가제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 기탁번호 KFCC11572P의 엔테로코커스 폐시움 L11 균주를 제공한다. 이때, 상기 균주는 담으로부터 분리된 것일 수 있다.
- [0008] 또한, 상기 균주는 사이토카인 IL-6 및 TNF- α 의 생성을 유도하는 것일 수 있다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 병원성 미생물에 의해 발생 되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 병원성 미생물에 의해 발생 되는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 유산균 제제를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 발효유를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따른 기탁번호 KFCC11572P의 엔테로코커스 폐시움 L11 균주 또는 이의 배양물은 여러 병원성 미생물에 대한 항균 효과를 가지며, 내산성, 인공위액 내성, 내담즙성 및 면역증강 효과가 우수하므로 생균제, 의약품, 건강식품, 유산균제제, 사료첨가제 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 본 발명에 따른 엔테로코커스 페시움 L11 균주의 계통발생학적 위치를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 유산균 균주 배양액에서 얻은 항균활성을 나타낸 것으로, 도 2a는 Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 52199에 대한 항균활성을 나타낸 사진으로 좌측은 pH 조정 전, 우측은 pH 7.0 조정 후를 나타내며, 도 2b는 *Enterococcus faecalis* ATCC 19433에 대한 항균활성을 나타낸 사진으로 좌측은 pH 조정 전, 우측은 pH 7.0 조정 후를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명에 따른 엔테로코커스 페시움 L11 균주를 대식세포에 처리한 다음, 활성능을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 엔테로코커스 페시움 L11 균주를 대식세포에 처리한 다음, 사이토카인 IL-6의 농도를 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 엔테로코커스 페시움 L11 균주를 대식세포에 처리한 다음, 사이토카인 TNF- α 의 농도를 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0018] 본 발명은 기탁번호 KFCC11572P의 신규한 엔테로코커스 페시움 L11 균주를 제공한다.
- [0019] 상기 균주는 건강한 닭의 맹장으로부터 다양한 유산균 종들을 분리하고, 분리된 균주의 생리 화학적 특성을 분석하여, 내산성, 내담즙산성 및 위해 미생물에 대한 항균 활성 및 면역증강 효과가 우수한 균주를 동정하였다. 상기 균주를 엔테로코커스 페시움 L11로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2013년 12월 4일자로 기탁하여 기탁번호 KFCC11572P를 부여받았다.
- [0020] 본 발명의 균주는 유해 미생물에 대하여 항균능이 있다. 특히, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33592, Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 52199, Extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *E. coli* 등 항생제 내성을 가지고 있는 균주에게 높은 항균력이 있으며, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150 같은 식중독 원인균에도 높은 항균활성을 가진다. 또한, 본 발명의 균주는 내산성 및 내담즙산성이 우수하며, 특히 사이토카인(Cytokine)의 분비, 특히 사이토카인 IL-6 및 TNF- α 의 생성을 유도하여 체내 면역 현상을 조절하는 등 면역증강 효과가 우수하여 인체의 면역계를 조절하는 중요한 역할을 담당할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물을 제공한다. 이때, 상기 배양물은 배양액의 농축액 및 건조물을 모두 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 따른 엔테로코커스 페시움 L11 균주 또는 이의 배양물은 유해 미생물에 대한 항균능, 내산성, 내담즙산성, 면역증강 효과가 우수하다. 따라서 본 발명의 엔테로코커스 페시움 L11 균주 또는 이의 배양물은 생균제, 특히 인체 의약품인 정장제나 유산균제제, 사료첨가제 및 건강식품 등에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는, 병원성 미생물에 의해 발생 되는 질환의 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다. 상기 병원성 미생물은 항생제 내성을 가지거나, 식중독을 일으키는 병원성 미생물인 것이 바람직하며, 상기 식중독을 일으키는 병원성 미생물은 살모넬라, 대장균, 바실러스 세레우스 균주 등인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 질환으로는 급성 설사, 장염, 위장관염, 변비, 복통, 복부팽만, 콜레라 및 식중독으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 조성물은 임상 투여시 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 주성분인 상기 엔테로코커스 페시움 L11 균주 또는 이의 배양물의 유효량이 1종 또는 2종 이상의 약학적으로 허용가능한 통상적인 담체 또는 1종 또는 2종 이상의 첨가제를 선택하여 통상적인 약학적 제형의 조성물로 제조할 수 있다.
- [0027] 담체는 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 방부제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할

수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 항산화제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.

- [0028] 본 발명에 있어서, 담체 및 첨가제는 약학적으로 허용가능한 것은 모두 가능하며, 구체적으로 희석제로는 유당, 옥수수 전분, 미세결정 셀룰로오스 또는 만니톨 등이 있고, 활택제로는 스테아린산 마그네슘 또는 탈크가 바람직하며, 결합제로는 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필셀룰로오스 중에서 선택되는 것이 바람직하다. 또한, 붕해제로는 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 전분글리콜산나트륨, 폴라크릴린칼륨 또는 크로스포비돈 중에서 선택되는 것이 바람직하고, 감미제로는 백당, 과당, 소르비톨 또는 아스파탐 중에서 선택되고 안정제로는 카르복시 메틸셀룰로오스나트륨, 베타-시클로덱스트린 또는 잔탄검 중에서 선택되며, 방부제로는 파라옥시안식향산 메틸, 파라옥시안식향산프로필 또는 소르빈산칼륨 중에서 선택되는 것이 바람직하다.
- [0029] 본 발명의 조성물은 병원성 미생물로 인해 발생하는 질환을 효율적으로 예방 또는 치료하는 목적으로 사용하는 것으로 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 것은 없으며, 음료, 분말, 캡셀, 연질캡셀, 정제, 껌, 점착 타입 조성물로 사용될 수 있으며, 로션, 연고, 겔, 크림, 패치 또는 분무제와 같은 경피 투여형 제형으로 사용할 수 있고, 탕제, 환제, 정제, 산제, 과립제 등의 제제로 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물에는 보조성분으로 비타민 B, C, E나 베타카로틴, Ca, Mg 등의 미네랄 함유 화합물이나 레시틴 등의 인지질 또는 말톨, 올리고당 등의 화합물을 사용할 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 성분 이외에도 공지의 첨가제로서 미각을 돋구기 위하여 매실, 레몬향, 파인애플향 또는 허브향과 같은 천연향료나 천연과즙, 플라보노이드 등의 천연색소 및 감미 성분인 과장, 벌꿀, 설탕 등과 구연산, 구연산 나트륨 같은 산미제를 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명의 군주 또는 이의 배양물을 포함하는 건강식품으로는 차, 젤리, 즙, 엑기스, 음료 등의 다양한 형태로 가공될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 군주 또는 이의 배양물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 각각의 군주 또는 이의 배양물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있다.
- [0034] 상기 식품의 종류에 특별히 제한되는 것은 없으며, 본 발명의 군주 또는 이의 배양물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 과자류, 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제 등이 있으며, 통상적인 건강식품을 모두 포함한다.
- [0035] 본 발명의 건강 음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있으며, 천연 탄수화물로는 포도당, 과당, 말토오스, 텍스트린, 자일리톨 등을 들 수 있고, 감미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 상기 군주 또는 배양물 100 ml당 0.01 내지 0.04 g이며 바람직하게는 0.02 내지 0.03 g이다.
- [0036] 상기 군주 또는 이의 배양물은 여러 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 유기산, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명은 상기 군주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 유산균 제제를 제공한다.
- [0038] 본 발명의 군주 또는 이의 배양물은 유산균 제제 100 중량부 당 0.01 내지 50 중량부인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니며 당업계의 통상의 기술자가 적절히 조절할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명은 상기 군주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 발효유를 제공한다.
- [0040] 본 발명의 군주 또는 이의 배양물은 발효유 100 중량부 당 0.01 내지 50 중량부인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니며 당업계의 통상의 기술자가 적절히 조절할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 군주 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제를 제공한다.
- [0042] 본 발명의 군주 또는 이의 배양물은 사료 첨가제 100 중량부 당 0.01 내지 50 중량부인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니며 당업계의 통상의 기술자가 적절히 조절할 수 있다.
- [0043] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상

의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0044] 실시예 1 : 균주의 분리 및 선별

[0045] 건강한 닭의 맹장으로부터 이용할 균주를 분리하기 위해 1 g 정도의 내용물을 10 g에 멸균수를 가한 후 섞어주고, 회석액 1 mL를 취해 10^5 , 10^6 , 10^7 배율로 단계별 회석하였다. 각 회석액을 0.1 mL씩 취하여 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) 한천고체배지(Difco, USA)에 도말 후 37 °C에서 48 시간 배양하여 각각의 배지에서 colony를 채취하여 총 20종의 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주의 유해 미생물에 대한 억제능을 확인하기 위해 Salmonella enteritidis ATCC 13076, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ATCC 33592, Vancomycin-resistant Enterococcus faecalis (VRE) ATCC 52199에 대하여 spot-on-lawn method로 실험 후 억제능이 가장 우수한 균주를 선별하였다.

[0046] 실시예 2 : 분리 및 선별한 균주의 동정

[0047] 선별한 균주의 동정을 위해 형태적, 생리적, 생화학적 특성을 조사하였으며, 16S rDNA 유전자 염기서열을 분석함으로써 균주를 최종적으로 동정하였다. 형태학적인 특성은 그람염색 후 현미경으로 관찰하였으며, 생리적, 생화학적 특성 조사는 API 50 CHL 키트 (Biomérieux, France)를 이용하여 37 °C에서 48 시간 배양 후 실시하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 하기 표 1에 기재된 +는 양성 반응을 의미하고, -는 음성 반응을 의미한다.

표 1

Characteristics	Reaction	Characteristics	Reaction
Morphology shape	cocci	Arbutin	+
Gram stain	+	Esculin	+
Control	-	Salicin	+
Glycerol	-	Celiobiose	+
Erythritol	-	Maltose	+
D-arabinose	-	Lactose	+
L-arabinose	+	Melibiose	-
Ribose D-ribose	+	Sucrose	+
D-xylose	-	Trehalose	+
L-xylose	-	Inulin	-
D-adonitol	-	Melezitose	-
Methyl-BD-xylopyranoside	-	Raffinose	-
D-galactose	+	Starch	-
D-glucose	+	Glycogen	-
D-fructose	+	Xylitol	-
D-mannose	+	Gentiobiose	+
L-sorbose	-	D-turanose	-
Rhamnose	-	D-lyxose	-
Dulcitol	-	D-tagatose	+
Inositol	-	D-fucose	-
Mannitol	+	L-fucose	-
Sorbitol	-	D-arabitol	-
α-Methyl-D-mannoside	-	L-arabitol	-
α-Methyl-D-glucoside	-	Gluconate	-
N-Acetyl-glucosamine	+	2-keto-Gluconat	-
Amygdalin	+	5-keto-gluconate	-

[0049] 16S rDNA 유전자 염기서열(서열목록 1)을 분석 및 분리 균주의 형태적, 생리적, 생화학적 및 유전적 특성을 조사한 결과 엔테로코커스 페시움 (Enterococcus faecium)과 높은 상동성을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 균주를 엔테로코커스 페시움 속 균주로 동정하고, 엔테로코커스 페시움 L11(Enterococcus faecium L11)로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 2013년 12월 4일자로 기탁하였고, 수탁번호 KFCC11572P를 부여받았다.

[0050] **실시예 3 : 내산성 및 인공위액 내성 검사**

[0051] 내산성 측정은 본 발명에 따른 균주 엔테로코커스 페시움 L11을 MRS 액체배지에서 37 °C 48 시간 배양한 후, 3M 염산으로 pH 2, 3으로 조정된 새로운 액체배지에 1×10^7 CFU/ml가 되도록 희석하였다. 희석된 균체들을 37 °C 에서 3 시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지 산성도를 중화시키기 위해서 소듐 인산염 완충액 (sodium phosphate buffer, 0.1M, pH 6.2)으로 균체를 연속적으로 희석시키고 37 °C에서 48 시간 배양한 후 MRS 평판배지 상에서 생균수를 측정하였다. 생존율은 초기 균의 농도와 MRS 평판배지 상에서 형성된 균의 콜로니의 비율을 비교하여 계산하였고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[0052] 인공위액 내성의 측정은 3M 염산에 의해 pH 3으로 조정된 MRS 액체배지를 멸균 후 1% 펩신(pepsin)을 첨가하여 인공위액을 만들어 측정하였으며, 이 후 실험은 상기에서 설명된 내산성 측정과 동일하게 실시하였고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

조건	3시간 후 생존율 (%)
pH 2	64.1±2.2
pH 3	70.2±1.5
pH 3 + pepsin	69.9±1.3

[0054] 균주가 생균제로 기능을 발휘하기 위해서는 pH 2.5~3.5 조건인 위를 통과해야 하며 (Holzapfel, WH. et al., International Journal of Food Microbiology 41: 85101, 1998), 음식물이 위를 통과하는 2~3시간 동안 높은 생존율을 보여야 한다. 생균제의 내산성은 pH 3에서 2시간 후 생존율을 기준으로 간주할 수 있으며 (Dora I. A. Pereira and Glenn R. Gibson, Applied and Environmental Microbiology, 68: 9, 46894693, 2002), 측정 결과 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 균주 엔테로코커스 페시움 L11은 pH 3에서 3시간 후 생존율이 70%이상임을 확인할 수 있다.

[0055] **실시예 4 : 내담즙성 검사**

[0056] 내담즙성 측정은 다음과 같이 실시하였다. 본 발명에 따른 엔테로코커스 페시움 L11 균주들을 MRS 액체배지에서 37 °C 48 시간 배양한 후, 다른 농도 (0.3, 1 %)의 Oxgall(Sigma, USA)이 함유된 MRS 평판 배지에 도말하여 37 °C에서 48 시간 동안 균의 성장 여부를 보았다.

[0057] Gilliland 등(Journal of Dairy Science, 67(12): 3045-3051, 1984)은 생균활성이 있는 생균이 가져야할 담즙액에 대한 내성은 oxgall이 0.3% 함유된 배지에서 성장할 수 있다고 보고하였으나, 실제로는 더 높은 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있어야 한다. 하기 표 3에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 균주 엔테로코커스 페시움 L11은 oxgall이 0.3% 함유된 배지에서 거의 영향을 받지 않았으며, 1% oxgall이 함유된 배지에서 초기 균수의 99.0%의 생존율을 나타내어 매우 강한 내담즙성을 가짐을 확인할 수 있다.

표 3

bile acid	생존율 (%)
0.3 %	99.7±0.1
1 %	99.0±0.7

[0059] **실시예 5 : 항균 활성 측정**

[0060] 병원균에 대한 항균활성은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; formerly NCCLS)의 디스크 확산법 (NCCLS M2-A7, 2000)에 준하여 측정하였다. 100 ml의 MRS 액체배지에 L11 전배양액을 1% 접종하여 37 °C, 48 시간 배양하고, 그 배양액을 8,000 g에서 원심분리한 후 얻은 상층액을 0.2 µm membrane filter로 여과하여 균체를 제거하였다. 동결건조기를 이용하여 상층액을 10배로 농축하고, 농축한 배양액은 0.2 µm membrane filter로 여과하여 항균활성 측정시료로 사용하였다. 측정법은 Mueller Hinton agar배지에 각 측정 대상 병원성

균의 농도가 1.5×10^8 CFU/ml가 되도록 멸균 생리 식염수에 희석한 접종 균액을 만든 후 면봉을 이용하여 고체 배지 표면에 균일하게 도포하였다. 그리고 항균활성 측정시료 80 μ l씩을 배지 안에 홀을 만들어 넣고 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 18-24 시간 배양하고 생육저해를 나타내는 inhibition zone (증식억제대)의 직경(mm)을 측정하여 하기 표4에 나타내었다.

[0061] 또한, 도 2는 본 발명에 따른 유산균 균주 배양액에서 얻은 항균활성을 나타낸 것으로, 도 2a는 Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 52199에 대한 항균활성을 나타낸 사진으로 좌측은 pH 조정 전, 우측은 pH 7.0 조정 후를 나타내며, 도 2b는 *Enterococcus faecalis* ATCC 19433에 대한 항균활성을 나타낸 사진으로 좌측은 pH 조정 전, 우측은 pH 7.0 조정 후를 나타낸다.

[0062] 측정 결과, 본 발명에 따른 엔테로코커스 폐시움 L11 균주에서 분리하는 항균물질은 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33592, Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 52199, Extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *E. coli* 등 항생제 내성을 가지고 있는 균주에게 높은 항균력을 가지고 있었으며, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150 같은 식중독 원인균에도 높은 항균활성이 관찰되었다.

[0063] 또한, 본 발명에 따른 엔테로코커스 폐시움 L11 균주의 항균활성이 산에만 의한 것이 아니라 항균물질의 생성에 의한 것임을 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다. 100 ml의 MRS 액체배지에 엔테로코커스 폐시움 L11 전배양액을 1% 접종하여 37 $^{\circ}$ C, 48 시간 배양하고, 그 배양액을 8,000 g에서 원심분리한 후 얻은 상층액을 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 균체를 제거하였다. 배양액의 낮은 pH로 인한 항균활성을 배제하기 위해 배양액의 pH를 7.0으로 조절한 후, 동결건조기를 이용하여 10배로 농축하였다. 농축한 배양액은 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 항균력 실험에 사용하였다. 항균력 시험은 위의 방법과 같으며, 생육저해를 나타내는 inhibition zone (증식억제대)의 직경(mm)을 관찰하여 하기 표 4에 나타내었다.

[0064] 측정 결과, pH가 7.0으로 조정된 배양액에서도 Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 52199, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Enterococcus hirae* ATCC 8043 등 *Enterococcus*에서 높은 증식 억제대를 관찰할 수 있었다. 따라서 본 발명에 따른 엔테로코커스 폐시움 L11 균주는 산 외에도 다른 항균물질을 생성함을 알 수 있었다.

표 4

Test strain	Inhibition zone (mm)	
	pH 4	pH 7
Gram-positive bacteria		
Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> (MRSA) ATCC 33592	13.8 $\pm$ 0.25	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	13.3 $\pm$ 0.25	0
Vancomycin-resistant <i>E. faecalis</i> (VRE) ATCC 52199	20.5 $\pm$ 0.5	16.5 $\pm$ 0.5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	19.8 $\pm$ 0.75	17.3 $\pm$ 0.75
<i>Enterococcus durans</i> ATCC 6056	21 $\pm$ 0.5	20.5 $\pm$ 0.75
<i>Enterococcus faecium</i>	16.5 $\pm$ 0.25	15 $\pm$ 1.0
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 8043	22.5 $\pm$ 1.5	20 $\pm$ 0.5
<i>Enterococcus galliranun</i> JCM 8728	20 $\pm$ 0.75	14.3 $\pm$ 1.75
<i>Bacillus cereus</i>	12.5 $\pm$ 0.5	0
Gram-negative bacteria		
Extended spectrum -lactamase (ESBL) producing <i>E. coli</i>	14.3 $\pm$ 0.25	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15.8 $\pm$ 0.25	0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	13.5 $\pm$ 0.25	0
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	15.5 $\pm$ 1.0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	14.5 $\pm$ 0.5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	20.0 $\pm$ 0.5	0

[0066] 실시예 6 : 면역 활성 측정

[0067] 면역활성은 대식세포(macrophage)의 활성능과 대식세포(macrophage)로부터 분리되는 사이토카인 interleukin-6 (IL-6)과 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 생성을 통하여 측정하였으며, 다음과 같은 방법을 이용하여 실

험하였다.

[0068] 시험대상균의 사균은 다음과 같이 획득하였다. 100 ml의 MRS 액체배지에 본 발명에 따른 엔테로코커스 페시움 L11 전배양액을 1% 접종하여 37 °C, 48 시간 배양하고, 그 배양액을 8,000×g에서 원심분리한 후 얻은 균체를 PBS (sodium phosphate buffered saline, pH 7.4)로 2 회 세정한 후 균체만 회수하여 121 °C, 15 분간 가열하였으며 8,000×g에서 10 분간 원심분리 한 다음 PBS에 회식하였다.

[0069] 대식세포(macrophage)는 대표적인 자연면역세포로서, 체내에 침투한 바이러스나 외부물질에 대한 탐식작용을 하며, 여러 작용 인자를 발생시켜서 체내의 다른 면역기관들을 자극시키는 역할을 하는 중요한 1차 면역세포이다. 대식세포의 활성능 측정을 위해 ICR (Imprinting Control Region) 마우스의 복강에 3% thioglycollate 배지(TG medium)를 2 ml 주입하고 48 시간 내에 유도된 대식세포를 회수한 후 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medium으로 2-3회 세척하고 세포수를 110^6 cells/mL 가 되도록 조정한 후 96 well plate에 200 µL씩 분주하였다. 이를 5% CO₂ incubator에서 배양(37 °C, 2시간)하여 macrophage monolayer를 형성시키고, 상등액을 제거한 후 각 well에 RPMI 1640 medium을 180 µL를 분주하고, L11 사균 샘플 20 µL를 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 1일간 배양하였다. 배양 후 WST-1(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt reagent) assay를 시행하여 대식세포의 활성능을 측정하였다. 샘플의 활성 정도를 평가하기 위해 lipopolysaccharide(LPS, Sigma Co.) 10 µg/mL을 양성 대조시료로 사용하였으며, PBS를 음성 대조시료(control)로 사용하였다 (도 3). 엔테로코커스 페시움 L11은 음성대조군(PBS)에 비해 높은 활성을 가지고 있었으며, 그 중 가장 높은 농도(1×10^8 cfu/mL)로 처리했을 때 67% 증가 효과를 보였다.

[0070] 대식세포(macrophage)에서 발생하는 항염증성 사이토카인은 IL-1, IL-6, IL-8(CXCL8), IL-12, TNF-α가 있다. 이 중 대표적으로 IL-6과 TNF-α은 급성기 반응을 유발하는데 핵심적인 역할을 하며, 이는 다양한 방법으로 숙주의 방어를 효과적으로 일으키도록 한다(Peter, Life science publishing Co., 233-246. 2006). Renshaw et al.(The Journal of Immunology 169(9): 4697-4701, 2002)은 대식세포로부터 분비되는 IL-6과 TNF-α 분비량이 감소 되면 면역기능의 현격한 저하를 나타내는 것으로 보았으며, 본 연구에서는 사이토카인 IL-6과 TNF-α를 측정하였다. 3% TG 배지로부터 유도된 마우스의 대식세포와 L11 사균 샘플을 이용하여 대식세포에서 생성되어 분비된 IL-6과 TNF-α의 양을 측정하였다. 사이토카인의 측정은 IL-6과 TNF-α ELISA kit (BD Opt EIA, BD Biosciences, USA)을 이용하였으며, 제공된 지시사항에 따라 실험을 진행하였다. 사이토카인 IL-6의 시험결과는 도 4와 같고, TNF-α의 시험결과는 도 5와 같다.

[0071] 도 4 및 5의 결과에 따르면, 본 발명에 따른 엔테로코커스 페시움 L11은 음성대조군(PBS)에 비해 사이토카인 IL-6과 TNF-α의 생성을 유도함을 볼 수 있었으며, TNF-α의 경우 양성대조군(LPS)보다 높은 사이토카인 생성을 확인 수 있었다.

수탁번호

[0072]

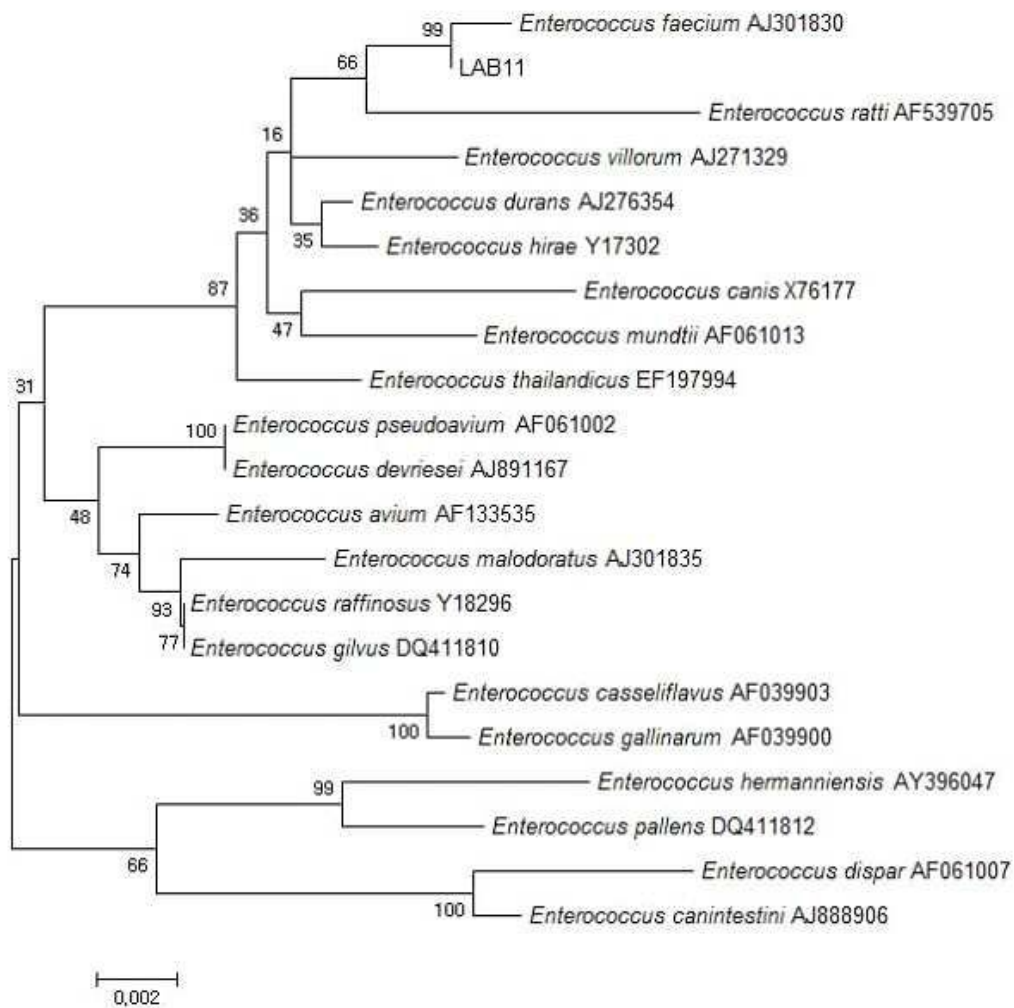
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11572P

수탁일자 : 20131204

도면

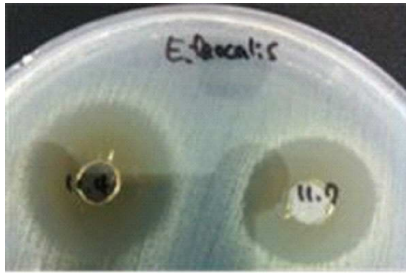
도면1



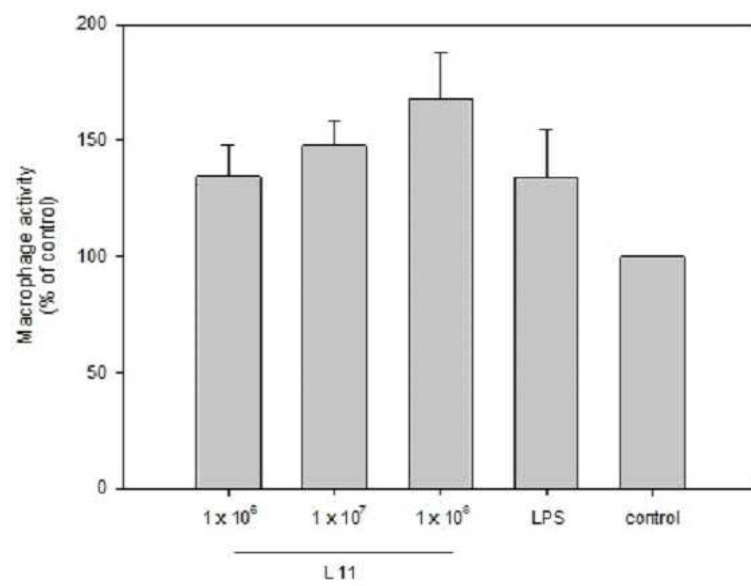
도면2a



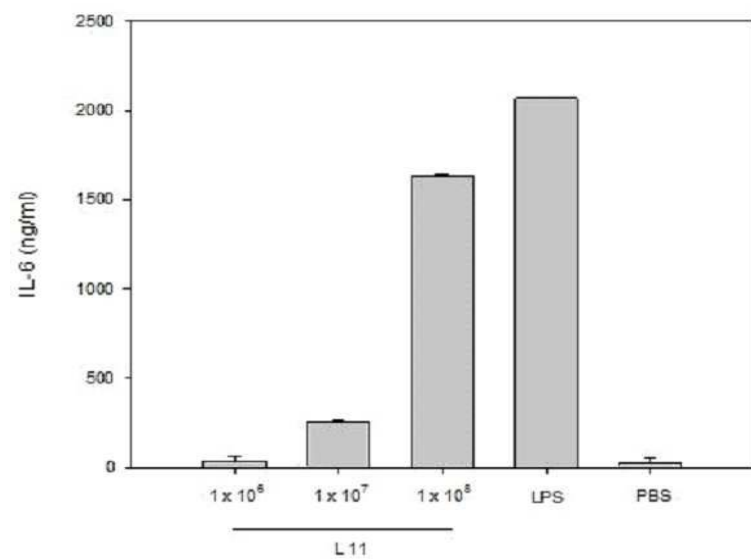
도면2b



도면3



도면4



도면5

